

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

<p>(19) 【発行国】 日本国特許庁 (J P)</p>	<p>(19)[ISSUING COUNTRY] Japan Patent Office (JP)</p>
<p>(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)</p>	<p>(12)[GAZETTE CATEGORY] Laid-open Kokai Patent (A)</p>
<p>(11) 【公開番号】 特開平 9 - 1 1 7 2 7 9</p>	<p>(11)[KOKAI NUMBER] Unexamined Japanese Patent (1997-117279) Heisei 9-117279</p>
<p>(43) 【公開日】 平成 9 年 (1 9 9 7) 5 月 6 日</p>	<p>(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION] (1997.5.6)</p>
<p>(54) 【発明の名称】 レシチン化スーパーオキシドデ イスムターゼおよびそれを有効 成分とする医薬</p>	<p>(54)[TITLE OF THE INVENTION] LECITHIN-IZING SUPEROXIDE DISMUTASE, AND PHARMACEUTICAL WHICH CONTAINS IT AS ACTIVE INGREDIENT</p>
<p>(51) 【国際特許分類第 6 版】 C12N 9/02 A61K 38/44 ABC ABE ABG ABL ABN ABS</p>	<p>(51)[IPC Int. Cl. 6] C12N 9/02 A61K 38/44 ABC ABE ABG ABL ABN ABS</p>
<p>【 F I 】 C12N 9/02 A61K 37/50 ABC ABE ABG</p>	<p>[FI] C12N 9/02 A61K 37/50 ABC ABE ABG</p>

JP9-117279-A



ABL	ABL
ABN	ABN
ABS	ABS

【審査請求】 未請求

[REQUEST FOR EXAMINATION] No

【請求項の数】 4

[NUMBER OF CLAIMS] 4

【出願形態】 O L

[FORM OF APPLICATION] Electronic

【全頁数】 7

[NUMBER OF PAGES] 7

(21) 【出願番号】

(21)[APPLICATION NUMBER]

特願平 7 - 2 7 7 4 6 9

Japanese Patent Application (1995-277469)
Heisei 7-277469

(22) 【出願日】

(22)[DATE OF FILING]

平成 7 年 (1 9 9 5) 1 0 月 2
5 日

(1995.10.25)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

[ID CODE]

5 9 5 0 2 7 8 1 5

595027815

【氏名又は名称】

[NAME OR APPELLATION]

株式会社サム研究所

K.K. Samu Research

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

東京都千代田区永田町 1 - 1 1
- 2 8 相互永田町ビル 4 階

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】
水島 裕

[NAME OR APPELLATION]
Yutaka Mizushima

【住所又は居所】
東京都世田谷区梅丘一丁目 1 番
1 1 号

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】
五十嵐 理慧

[NAME OR APPELLATION]
Igarashi Toshisato

【住所又は居所】
神奈川県川崎市多摩区南生田五
丁目 8 番 2 号

[ADDRESS OR DOMICILE]

(74) 【代理人】

(74)[AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】
内田 明 (外 2 名)

[NAME OR APPELLATION]
Uchida Akira (other two)

(57) 【要約】

(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]

【課題】
薬理活性が強化されたレシチン
化スーパーオキシドディスムタ
ーゼおよびそれを有効成分とす
る医薬を提供しようとするもの
である。

[SUBJECT OF THE INVENTION]
The lecithin-izing superoxide dismutase with
which the pharmacological activity was
reinforced, and the pharmaceutical which
contains it as an active ingredient are provided.

【解決手段】

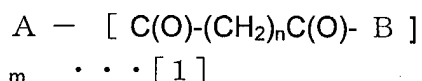
銅及び／又は亜鉛が配位した、111位のシステインのメルカプト基に2-ヒドロキシエチルチオ基が導入されたヒト型スーパーオキシドディスムターゼに、リゾレシチンを化学的橋かけで結合させてなるレシチン化スーパーオキシドディスムターゼおよびそれを有効成分とする医薬である。

[PROBLEM TO BE SOLVED]

The lecithin-izing superoxide dismutase which combined the lysolecithin with the human-type superoxide dismutase which copper and/or zinc configured, and by which 2-hydroxy ethylthio group was introduced into the mercapto group of the cystein of the 111st position by the chemical crossbond, and it is the pharmaceutical which contains it as an active ingredient.

【特許請求の範囲】**[CLAIMS]****【請求項1】**

下記式〔1〕で表されるレシチン化スーパーオキシドディスムターゼ。



ただし、

A：銅及び／又は亜鉛が配位した、111位のシステインのメルカプト基に2-ヒドロキシエチルチオ基が導入されたヒト型スーパーオキシドディスムターゼの残基、

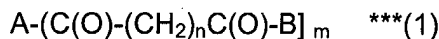
B：グリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンの、その2位の水酸基の水素原子を除いた残基、

m：1以上の整数、

n：2以上の整数。

[CLAIM 1]

The lecithin-izing superoxide dismutase expressed with following formula (1).



However, a: The residue of the human-type superoxide dismutase by which 2-hydroxy ethylthio group was introduced into the mercapto group of the cystein of the 111st position which copper and/or zinc configured, b: The residue except the hydrogen atom of the hydroxyl group of the 2-position of the lysolecithin which has a hydroxyl group in 2-position of a glycerol, m : 1 or more integer, n : two or more integers.

【請求項2】**[CLAIM 2]**

n が 2 ～ 10 の整数である、請求項 1 のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼ。
The lecithin-izing superoxide dismutase of Claim 1 which is the integer of n2-10.

【請求項 3】

m が平均して 1 ～ 16 である、請求項 1 または 2 のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼ。

[CLAIM 3]

The lecithin-izing superoxide dismutase of Claim 1 or 2 which m averages and is 1-16.

【請求項 4】

請求項 1、2 または 3 のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼを有効成分として含む医薬。

[CLAIM 4]

The pharmaceutical which contains the lecithin-izing superoxide dismutase of Claim 1, 2 or 3 as an active ingredient.

【発明の詳細な説明】**[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]****【 0 0 0 1 】****[0001]****【発明の属する技術分野】**

本発明は、レシチン化スーパーオキシドディスムターゼ、およびそれを有効成分とする医薬に関する。

[TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION]

This invention relates to a lecithin-izing superoxide dismutase and the pharmaceutical which contains it as an active ingredient.

【 0 0 0 2 】**[0002]****【従来の技術】**

薬物の効果を高め、副作用を減らす試みは、古くから行われてきているが、近年応用され始め

[PRIOR ART]

The trial which heightens the effect of a medicine and reduces a side effect has been performed from old times.

ているものの一つとしてドラッグデリバリーシステム(DDS)がある。DDSとは、薬物を必要とする部位へ、なるべく選択的に、必要な時間の間移行させ、それにより薬物の効果を高め全身的な副作用を大幅に減少させる試みである。

【0003】

DDSに用いられるキャリアとしては種々のものがあり、例えばリポソームとリピッドマイクロスフェアを挙げることができる。リポソームは、天然に存在する脂質、例えばレシチン、コレステロールなどを有機溶媒に溶解し、超音波処理などで水に拡散させ、これに薬物を封入させたものである。一方、リピッドマイクロスフェアは、大豆油をレシチンとともに水に懸濁したものであり、レシチンがその表面にあり、内部に薬物が封入されている。

【0004】

両者とも、薬物は主として物理的な結合により内部に封入されている。リポソームは、安定性が悪く、またリピッドマイクロスフェアは、封入する薬物が脂溶性であることが要求され、その上特殊な製造装置を使用する必要がある。

However, although it is beginning to apply in recent years, there is a drug delivery system (DDS) as one.

A medicine is made to move to the site made necessary during necessary time in DDS as selectively as possible.

This heightens the effect of a medicine, it is the trial which decreases a systemic side effect sharply.

[0003]

There is a thing various as a carrier used for DDS.

For example, a liposome and a lipid microsphere can be mentioned.

A liposome dissolves the lipid which exists naturally, for example, a lecithin, cholesterol, etc. in an organic solvent, and water is made to diffuse it in a ultrasonication etc.

This was made to seal a medicine.

On the other hand, the lipid microsphere suspended the soy bean oil in water with the lecithin.

A lecithin is shown in the surface.

It seals the medicine inside.

[0004]

As for the medicine, it seals both inside mainly according to a physical connection.

Stability of a liposome is bad and it is required that a lipid microsphere should have the fat-soluble medicine which seals, it is necessary to use manufacturing equipment special moreover.

【0005】

一方、スーパーオキシドディスムターゼ（以下、それをSODと略記する）は、動物、植物、微生物などの生体内に広く分布し、遊離（フリー）の反応性に富む活性酸素であるスーパーオキシドアニオンラジカルを分解する酵素として知られている。薬物の面では、スーパーオキシドによって引き起こされる種々の疾患に対する予防薬、治療薬（例えば、炎症、変形性関節炎、慢性関節リウマチ、紫外線照射による障害、未熟児酸素網膜症、白内障、アドリアマイシンなどの制癌剤の副作用、虚血部分への血流再開に伴う障害、心筋梗塞または臓器移植の際の使用など）などとして期待されている（抗炎症剤としては、ファルマシア、17巻、411頁（1981年）参照）。

[0005]

On the other hand, a superoxide dismutase (it is hereafter abbreviated as SOD) is distributed widely in the living body, such as an animal, a plant, and microorganisms, it is known as an enzyme which degrades the superoxide anion radical which is the active oxygen which is rich in the reactivity of liberation (free). In respect of the medicine, it anticipates as the various prophylactic agent with respect to the illness caused by the superoxide, therapeutic agent (for example, use in the case of the damage, myocardial infarction, or organ transplant accompanied to the side effect of anticancer drugs, such as damage by inflammation, the arthritis deformans, the rheumatoid arthritis, and the ultraviolet irradiation, a premature-infant oxygen retinopathy, cataract, and an adriamycin, and the blood-flow restart to an ischemia part etc.), etc. (as an anti-inflammable agent, it is Pharmacia, 17 volumes, and 411 see page (1981))

【0006】**【発明が解決しようとする課題】**

SODを静脈内投与した場合、細胞親和性が低く、かつその血中半減期は僅か4～6分とされており、SODは速やかに尿中に排泄される。SODの血中半減期を増大させるために、SO

[0006]**[PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION]**

When SOD is intravenously administered, cell affinity is low, and the blood half life is made into small 4-6 minutes, and SOD is promptly excreted in urine.

In order to increase the blood half life of SOD, SOD was modified by the ficoll,

Dをフィコール、ポリエチレングリコール、ラットアルブミン、デキストランで修飾し、巨大化させることが試みられてきた。

polyethyleneglycol, the rat albumin, and the dextran, and growing large has been tried.

【0007】

しかし、フィコールまたはポリエチレングリコールで修飾されたSODには抗原性があることが報告されている。また、デキストランによる修飾では、SODの抗炎症作用の増強が認められるが、免疫原性を抑制する効果は認められない。

[0007]

However, it is reported to SOD which it modified by the ficoll or polyethyleneglycol that there is an antigenicity.

Moreover, reinforcement of the anti-inflammatory activity of SOD is accepted in the modification by the dextran.

However, the effect which suppresses an immunogen student is not accepted.

【0008】

従来知られている種々の修飾SODは、すでに報告されている上記の理由、または巨大分子化に伴う組織内浸透性の低下などの点でいずれも実用上問題があった。従って、いずれの修飾SODも臨床応用には至っていないのが現状である。

[0008]

The various modification SOD known conventionally all had problems practically by the above-mentioned reason (or points accompanied to macromolecule-ization, such as a fall of tissue endosmosis property) already reported.

Therefore, the present condition is that any modification SOD does not result in clinical application, either.

【0009】

一方、本発明者らは、SODのDDS化について検討した結果、SODに化学的橋かけでレシチンを結合させたレシチン化スーパーオキシドディスムターゼを見い出した（特開平3-163100号公報参照）。また、このSODとして、銅および／または亜鉛が配位した、111

[0009]

On the other hand, the present inventors considered DDS-ization of SOD.

Consequently, the lecithin-izing superoxide dismutase which combined the lecithin with SOD by the chemical crossbond was found out (see Unexamined-Japanese-Patent No. 3-163100).

Moreover, it found that SOD derived from the human the 111st position of whose which

位がセリンであるヒト由来の S copper and/or zinc configured is serine is also
 ODが適当であることも見いだ suitable as this SOD (see
 した (特開平 6-54681 号 Unexamined-Japanese-Patent No. 6-54681).
 公報参照)。

【0010】

[0010]

【問題を解決するための手段】
 本発明者らは、これら従来のものとは全く異なり、しかも優れた効果を挙げることができるレシチン化スーパーオキシドディスムターゼについて検討した結果、下記特定のスーパーオキシドディスムターゼを用いたレシチン化スーパーオキシドディスムターゼを見い出した。

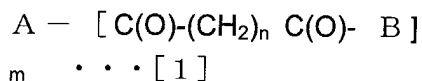
[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]

The present inventors examined the lecithin-izing superoxide dismutase which can mention the effect which was moreover excellent completely unlike these former. Consequently, the lecithin-izing superoxide dismutase using the superoxide dismutase of the following specification was found out.

【0011】

[0011]

本発明は、この特定のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼ、およびそれを有効成分とする薬剤である。下記式 [1] で表されるレシチン化スーパーオキシドディスムターゼ。



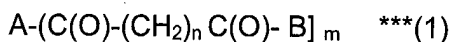
ただし、

A : 銅および/または亜鉛が配位した、111 位のシステインのメルカプト基に 2-ヒドロキシエチルチオ基が導入されたヒト型スーパーオキシドディスムターゼの残基、

B : グリセロールの 2 位に水酸

This invention is this specific lecithin-izing superoxide dismutase and a medicine which contains it as an active ingredient.

The lecithin-izing superoxide dismutase expressed with following formula (1).



However, a: The residue of the human-type superoxide dismutase by which 2-hydroxy ethylthio group was introduced into the mercapto group of the cystein of the 111st position which copper and/or zinc configured, b: The residue except the hydrogen atom of the hydroxyl group of the 2-position of the lysolecithin which has a hydroxyl group in 2-position of a glycerol, m : 1 or more integer, n : two or more integers.

基を有するリゾレシチンの、その2位の水酸基の水素原子を除いた残基、
 m : 1以上の整数、
 n : 2以上の整数。

【0012】

[0012]

【発明の実施の形態】

本発明のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼは、従来のSODとは生物体内分布、細胞親和性が著しく異なり、かつ残存活性が90%以上の極めて均一な活性を保持したものが得られ、従ってSODの薬理活性の強化、副作用の低下、吸収促進が期待できる。

[EMBODIMENT OF THE INVENTION]

As for the lecithin-izing superoxide dismutase of this invention, an organism inside-of-the-body distribution and cell affinity differ from the conventional SOD remarkably, and the thing holding very uniform activity whose residual activity is 90 % or more is obtained, therefore, reinforcement of the pharmacological activity of SOD, the fall of a side effect, and promotion of absorption are expectable.

【0013】

[0013]

本発明のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼは、通常、リゾレシチンの残基に化学的に橋かけ剤を結合させたレシチン誘導体を、銅および／または亜鉛が配位した、かつ111位のシステインのメルカプト基に2-ヒドロキシエチルチオ基が導入されたヒト型スーパーオキシドディスムターゼ（以下、Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SODという）に1個以上結合させて得られる。

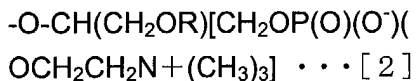
The lecithin-izing superoxide dismutase of this invention is carried out in this way usually, and is obtained.

Human-type superoxide dismutase by which copper and/or zinc configured the lecithin derivative which combines a cross-linking medicine with the residue of a lysolecithin chemically, and 2-hydroxy ethylthio group was introduced into the mercapto group of the cystein of the 111st position (it is called the following and Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD) An one or more connection is carried out.

【0014】

[0014]

Bは、下記式〔2〕で表されるグリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンの、その2位の水酸基の水素原子を除いた残基である。

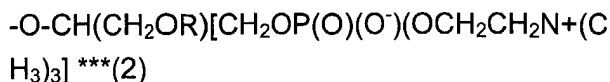


上記式において、Rは脂肪酸残基（アシル基）であり、特に炭素数8～30の飽和～不飽和の脂肪酸残基が好ましい。特に好ましいRは、ミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、その他の炭素数14～22の飽和脂肪酸残基である。Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SODにリゾレシチンの残基が2個以上ある場合は、それらリゾレシチンの残基におけるRは異なってもよい。

【0015】

上記式〔1〕中、 $\text{-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{C(O)-}$ は化学的橋かけ剤の残基を表す。この化学的橋かけ剤の残基は、 $\text{HO-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{C(O)-OH}$ で表される直鎖ジカルボン酸、およびその無水物、そのエステル、その他のそのジカルボン酸の反応性誘導体からなる化学的橋かけ剤の両水酸基を除いた残基である。以下、この残基を化学的橋かけという。

B is a residue except the hydrogen atom of the hydroxyl group of the 2-position of the lysolecithin which has a hydroxyl group in 2-position of the glycerol expressed with following formula (2).



In said Formula, R is a fatty-acid residue (acyl group).

The fatty-acid residue of C8-30 saturated-unsaturation is desirable in particular. Especially preferable R is a myristoyl group, the palmitoyl group, a stearyl group, and another C14-22 saturated fatty acid residue.

When there are two or more residues of a lysolecithin in Cu-Zn type Cys-111-ME-h-SOD, R in the residue of these lysolecithins are may be different.

[0015]

$\text{-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{C(O)-}$ expresses the residue of a chemical-crossbond medicine among said Formula (1).

The residues of this chemical-crossbond medicine are linear dicarboxylic acid expressed with $\text{HO-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{C(O)-OH}$ and its anhydride, its ester, and a residue except both the hydroxyl groups of a chemical-crossbond medicine that are made of a reactive derivative of those other dicarboxylic acid.

Hereafter, this residue is called chemical crossbond.

【0016】

この化学的橋かけは、上記リゾレシチン残基とエステル結合で結合している。また、化学的橋かけの他端は、Cu-Zn型Cys-111-ME-SODのアミノ基とアミド結合などにより直接結合していると考えられる。この式において、 n は2以上の整数であり、 $-(CH_2)_n-$ は直鎖アルキレン基を表し、特に n が2~10の直鎖状アルキレン基が好ましい。

[0016]

This chemical crossbond is connected by the above-mentioned lysolecithin residue and the ester bond.

Moreover, other end of a chemical crossbond, It is thought that it couples directly by an amino group, an amide bond, etc. of Cu- Zn type Cys-111-ME-SOD.

In this equation, n is two or more integers.

$-(CH_2)_n-$ expresses a linear alkylene group, the linear alkylene group of 2-10 has in particular desirable n .

【0017】

上記式[1]で表されるレシチン化Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SODは、例えばCu-Zn型組換えh-SODと式[3]のリゾレシチン誘導体とにより製造される。

$Z-C(O)-(CH_2)_nC(O)-B \cdots [3]$

上記式中、 B 、 n は式[1]の場合と同様である。式[3]中 Z は水酸基、または活性エステルを形成する基からカルボニル基を除いた基を表す。例えば、 p -ニトロフェノール、3,5-トリクロロフェノール、ペンタフルオロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、 N -ヒドロキシスクシンイミド、 N -ヒドロキシピペリジン、 N -ヒドロキシ-5-ノボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド、8-ヒドロキシキノリン、2-ヒドロキシピリジンなどの水

[0017]

Lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD expressed with said Formula (1), for example, it manufactures by Cu- Zn type recombinant h-SOD and the lysolecithin derivative of Formula (3).

$Z-C(O)-(CH_2)_nC(O)-B^{***}(3)$

In the above formula, B and n are the same as that of the case of Formula (1).

In Formula (3), Z expresses the group excluding the carbonyl group from the hydroxyl group or the group which forms an activated ester.

For example, it is a group except the hydrogen atom of the hydroxyl group of hydroxyl-containing compounds, such as p -nitrophenol, the 3,5- trichlorophenol, a pentafluoro phenol, a 2, 4 dinitrophenol, N -hydroxysuccinimide, N - hydroxy piperidine, a N -hydroxy- 5-norbornene -2,3- dicarboxylic acid imide, 8-hydroxyquinoline, and 2-hydroxy pyridine.

The well-known method can be used about the

酸基含有化合物の水酸基の水素原子を除いた基である。活性エステル体の合成法については公知の方法を用いることができる（泉屋他、「ペプチド合成の基礎と実験」(1985)丸善（株）発行、参照）。

synthesis method of an activated-ester object ("foundation of peptide synthesis and experiment" Izumiya, and others, (1985) Maruzen Co., Ltd. issue, reference).

【0018】

式 [3] で表されるリゾレシチン誘導体と Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD との結合方法としては、例えば以下のものが挙げられる。式 [3] において Z が水酸基の場合はカルボジイミド法により行われる。カルボジイミド類としては、ジエチルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。たとえば、1～10wt%の [3] の化合物の水溶液を塩酸で pH4～6 に調製し、室温または 0℃で 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを加え、再度 pH を 4～6 に調製する。SOD を加え室温または 0℃で 1 時間 pH を 4～6 に保持しその後 5～20 時間攪拌し、レシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD を得る。

[0018]

As the joint method of of the lysolecithin derivative and Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD which are expressed with Formula (3), the following are mentioned, for example.

When Z is a hydroxyl group in Formula (3), it is carried out by the carbodiimide method.

As carbodiimide, diethyl carbodiimide, diisopropyl carbodiimide, a dicyclohexylcarbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide, etc. are mentioned.

For example, the aqueous solution of the compound of 1 to 10-wt% (3) is prepared to pH4-6 with the hydrochloric acid, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide is added at room temperature or 0 degrees-Celsius, and pH is again prepared to 4-6.

SOD is added, and at room temperature or 0 degrees-Celsius, pH is maintained to 4-6 for 1 hour, and, after that, it stirs for 5 to 20 hours, lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD is obtained.

【0019】**[0019]**

式〔3〕においてZが活性エステルを形成する基からカルボニル基を除いた基を表す場合は、Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SODと直接結合させることができる。反応は、ホウ酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、重炭酸ナトリウムなどの塩の水溶液中でレシチン誘導体とCu-Zn型Cys-111-ME-h-SODを混合することによって行われる。

【0020】

必要に応じて、N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、N,N-ジメチルアセトアミド、スルホラン、ジメチルスルホキシド、アセトン、1,4-ジオキサソラン、メタノールなどの有機溶媒を加えておくことができる。反応温度は -20～50℃が好ましく、0～20℃が更に好ましい。反応時間は反応温度、混合方法により異なるが通常2～24時間である。

【0021】

式〔3〕で表されるレシチン誘導体の仕込量は、Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SODのアミノ基に対して0.2～8モル量が適当である。この仕込み比によってCu-Zn型Cys-111-ME-h-SODに結合させるレシチン誘導体（式〔3〕）の分子数を調整すること

When Z, in Formula (3), expresses the group excluding the carbonyl group from the group which forms an activated ester, direct coupling can be carried out to Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD.

Reaction is performed by mixing a lecithin derivative and Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD in the aqueous solution of salts, such as sodium borate, sodium phosphate, potassium phosphate, and a sodium bicarbonate.

[0020]

As required, organic solvents, such as a N, N dimethylformamide, N- methyl pyrrolidone, a N, N- dimethylacetamide, a sulfolane, dimethyl sulfoxide, acetone, a 1,4- dioxane, and methanol, can be added.

-20-50 degrees-Celsius of reaction temperature is desirable, and its 0-20 degrees-Celsius is still more desirable.

Although the reaction time changes with reaction temperature and mixed method, it is normal 2 to 24 hours.

[0021]

0.2-8 molar quantity is suitable for the charged amount of the lecithin derivative expressed with Formula (3) to the amino group of Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD.

The number of molecules of the lecithin derivative (Formula (3)) combined with Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD by this preparation ratio can be adjusted.

ができる。

【0022】

このようにして得られた反応液にはレシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD と未反応 Cu-Zn

Cys--111-ME-r-h-SOD、および未反応レシチン誘導体が共存するが、反応液をゲル濾過およびイオン交換カラムクロマトグラフィーに付することにより所望のレシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD を得ることができる。また、このようにして得られたレシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD は、通常 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD に種々の数のレシチン誘導体が結合して得られたものの混合物である。

[0022]

Thus, in the obtained reaction mixture, lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD, unreacted Cu- Zn type Cys--ME-r-h-SOD, and a unreacted lecithin derivative coexist.

However, desired lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD can be obtained by attaching a reaction mixture to a gel filtration and ion-exchange column chromatography.

Moreover, lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD obtained by doing in this way is a blend, although various number of lecithin derivatives connected together and were obtained by normal Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD.

【0023】

有効成分化合物として Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD に結合するレシチン誘導体の分子数が均一になるようなレシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD が所望される場合には、前記の方法により得られるレシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD を更にゲル濾過、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどの操作に付することにより所望の数のレシチン誘導体が結合したレシチン化 Cu-Zn 型

[0023]

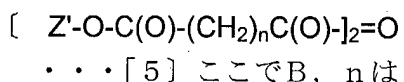
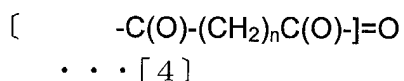
When asking for lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD to which the number of molecules of the lecithin derivative connected with Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD as an active-ingredient compound becomes uniform, lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD which the lecithin derivative of a desired number connected can be obtained by attaching further lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD obtained by the above-mentioned method to operation of a gel filtration, ion-exchange column chromatography, etc.

Cys-111-ME-h-SOD を得ることが可能である。Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD 1 分子あたりのレシチン結合数 (式 [1] における m) は、特に限定されるものではないが、1~16 が好ましく、特に 1~10 が好ましい。

In particular the lecithin connection number per Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD 1 molecule (m in Formula (1)) is not limited. However, 1-16 is desirable and in particular 1-10 is desirable.

【0024】

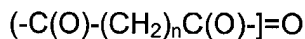
式 [3] の化合物の製造方法としては、下記式 [4] で表される酸無水物を H-B で表されるリゾレシチンに反応させる方法、または、下記式 [5] で表されるジカルボン酸ハーフエステル無水物を H-B で表されるリゾレシチンに反応させる方法により得られる。



ここで B , n は式 [1] の場合と同様である。 Z' はカルボキシル基の保護基、たとえば、アルキル基、メトキシメチル基、ベンジル基、フェナシル基、 t -ブチルジメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリメチルシリル基などを表す。

[0024]

It is obtained by the method of making the acid anhydride expressed with following formula (4) react to the lysolecithin expressed with H-B as a manufacturing method of the compound of Formula (3), or the method of making the dicarboxylic acid half ester anhydride expressed with following formula (5) react to the lysolecithin expressed with H-B.



*** (4)



*** (5)

B and n are the same as that of the case of Formula (1) here.

Z' expresses the protecting group of a carboxyl group, for example, an alkyl group, a methoxymethyl- group, a benzyl group, a phenacyl group, t - butyl dimethyl-silyl group, a triethyl silyl group, a trimethyl-silyl group, etc.

【0025】

これら酸無水物やハーフエステル無水物を用いて式 [3] の化合物を製造する反応は、通常溶

[0025]

Reaction which manufactures the compound of Formula (3) using these acid anhydrides or a half ester anhydride is performed in a normal

媒中で行われ、必要により有機塩基を共存させて行う。反応溶媒としては、たとえば、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素が用いられ、有機塩基としては、たとえば、ピリジン、ピペリジン、トリエチルアミン、4-ジメチルアミノピリジン、4-ペリジノピリジンなどが用いられる。反応温度は20～80℃が好ましく、40～60℃がさらに好ましい。反応時間は通常2～24時間である。

【0026】

式[5]の製造方法としては、当該するカルボン酸ハーフエステルをベンゼン、トルエン、クロロホルム、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、などの溶媒中でカルボジイミドと混合させることにより得られる。カルボジイミドとしては、たとえば、ジエチルカルボジイミド、ジソプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。反応温度は、-20℃から溶媒還流温度までの範囲を用いることができるが、好ましくは、0℃から室温程度の温度を用いる。

【0027】

本発明で用いる Cu-Zn 型

solvent, it carries out by coexisting an organic base if necessary.

As a reaction solvent, halogenated hydrocarbons, such as chloroform, are used, for example, as an organic base, a pyridine, a piperidine, a triethylamine, 4-dimethylamino pyridine, 4-piperidino pyridine, etc. are used, for example.

For reaction temperature, 20-80 degrees-Celsius is preferably.

40-60 degrees-Celsius is further desirable.

The reaction time is normal 2 to 24 hours.

[0026]

As a manufacturing method of Formula (5), it is obtained by mixing said carboxylic acid half ester to carry out with carbodiimide in solvent, such as benzene, toluene, chloroform, a dichloromethane, and tetrahydrofuran.

As carbodiimide, diethyl carbodiimide, diisopropyl carbodiimide, a dicyclohexylcarbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide, etc. are used, for example.

The range from -20 degrees-Celsius to solvent reflux temperature can be used for reaction temperature.

Preferably, the temperature about room temperature is used from 0 degrees-Celsius.

[0027]

Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD used by this

Cys-111-ME-h-SOD は、たとえばヒト型スーパーオキシドディスムターゼとビス (2-ヒドロキシエチル) ジスルフィドとを反応させることによって得られる (特開平 6-199895 号公報参照)。ヒト型スーパーオキシドディスムターゼは、天然型ヒト SOD と実質上同一のアミノ酸配列を有するものであり、たとえば、特開昭 61-111690 号公報などに記載の方法によって得ることができるし、あるいは市販品として入手することもできる。

invention is obtained by making for example, a human-type superoxide dismutase and a bis(2-hydroxyethyl disulfide react (see Unexamined-Japanese-Patent No. 6-199895).

A human-type superoxide dismutase has the substantially same amino acid sequence as the natural-type human SOD.

For example, it can obtain by the method of a publication in Unexamined-Japanese-Patent No. 61-111690 etc.

Or it can also obtain as a commercial article.

【0028】

本発明における製剤の形態としては、注射剤、直腸吸収剤、経鼻吸収剤などが挙げられる。注射剤は、たとえば本有効成分を緩衝剤、等張剤、pH 調節剤、安定化剤と適量に溶解した注射用蒸留水に溶解し、除菌フィルタを通して無菌化したものをアンプルに分注するか、バイアル瓶に分注して凍結乾燥することにより調製される。

[0028]

As a form of the formulation in this invention, an injection, a transrectal agent, a per-nasal absorber, etc. are mentioned.

An injection dissolves for example, this active ingredient in the water for injection dissolved in a buffer, the isotonic medicine, the pH regulator, the stabilizer, and the suitable quantity, it is prepared by dispensing in an ampoule that which sterilized through the sterilization filter, or dispensing and freeze-drying to a vial container.

【0029】

本発明のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼのヒトに対する投与量は、特に限定されるものではないが、約 0.0001 ~ 100mg / 人程度が適当であり、特に約 0.001 ~ 10mg / 人程度

[0029]

In particular the dosage with respect to the human of the lecithin-izing superoxide dismutase of this invention is not limited.

However, about 0.0001 - 100 mg / human grade is suitable.

About 0.001 - 10 mg / human grade is desirable

が好ましい。なお、1mg は 3000 in particular.

ユニット (U) に相当する。以 In addition, 1 mg is corresponded to 3000 units (U).

下に本発明を具体的に説明する (U). This invention is demonstrated concretely below.

が、本発明はこれら実施例に限られるものではない。

However, this invention is not restricted to these Examples.

【 0 0 3 0 】

[0030]

【実施例】

[EXAMPLES]

(合成例 1)

(Synthesis example 1)

9-ベンジルオキシカルボニル
-1- ノナン酸無水物の合成

A synthesis of a 9-benzyloxycarbonyl -1-nonoic-acid anhydride

9-ベンジルオキシカルボニル
-1- ノナン酸 15 g (51mmol)を
ベンゼン 50ml に溶解させ 0℃
に冷却し、DCC (1,3-ジシク
ロヘキシルカルボジイミド)
5.8 g (28mmol)を加え、室温で

15g (51 mmol) of 9-benzyloxycarbonyl -1-nonoic acids is dissolved in benzene 50 ml, and it cools to 0 degrees-Celsius, dCC(1,3-dicyclohexylcarbodiimide)5.8g (28 mmol) was added, and it stired at room temperature for 15 hours.

15 時間攪拌した。不溶物をセラ
イトで濾過し、減圧濃縮して、
標記化合物を得た。

An insoluble matter is filtered by cerite, it evaporates, the title compound was obtained.

【 0 0 3 1 】

[0031]

(合成例 2)

(Synthesis example 2)

2-(9-ベンジルオキシカルボニ
ルノナノイル) リゾレシチンの
合成

A synthesis of 2-(9-benzyloxycarbonyl nonanoyl) lysolecithin

グリセロールの 2 位が水酸基で
ある リゾレシチン 3 g
(5.9mmol) のクロロホルム-ピ
リジン(80ml/20ml) 懸濁液に、
DMP(N,N- ジメチルアミノピ
リジン) 2.16 g (17.7mmol) 、

2-position of a glycerol adds DMP(N, N-dimethylamino pyridine) 2.16g (17.7 mmol) and 10.0g (17.7 mmol) of 9-benzyloxycarbonyl -1-nonoic-acid anhydrides to lysolecithin 3g (5.9 mmol) chloroform-pyridine (80 ml / 20 ml) suspension which is a hydroxyl group, it stired at 60 degrees-Celsius for 15 hours.

9-ベンジルオキシカルボニル
 -1- ノナン酸無水物 10.0 g (17.7mmol)を加え、60℃で 15 時間撹拌した。その後、反応液を減圧濃縮し、残渣にクロロホルム：メタノール：水＝4：5：1 (10ml) を加えて溶解し、同液にて平衡化したイオン交換カラム (Dowex 50W-X8) に通した。

After that, a reaction mixture is evaporated, to the residue was added chloroform:methanol:water =4:5:1(10 ml) and dissolved.

It let it pass to the ion exchange column (Dowex50 W-X8) which equilibrated with this liquid.

【0032】

TLCにより目的化合物を分画し、溶媒を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムにより、精製し、標記化合物 3.91 g (5.0mmol、85%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃)
 0.84(t,3H),1.20(brs),1.50-1.70(brs,6H),2.20-2.40(brs,6H),3.38(s,9H),3.80-4.00(m,4H),4.20-4.40(m,4H),5.10(s,2H),5.20(m,1H),7.30(m,5H).

[0032]

A target compound is fractionated by TLC, after evaporating a solvent, a silica-gel column purifies a residue, 3.91g (5.0 mmol, 85 %) of title compounds was obtained.

¹H-NMR(CDCl₃)
 0.84(t,3H),1.20(brs),1.50-1.70(brs,6H),2.20-2.40(brs,6H),3.38(s,9H),3.80-4.00(m,4H),4.20-4.40(m,4H),5.10(s,2H),5.20(m,1H),7.30(m,5H).

【0033】

(合成例3)

2-(9- ヒドロキシカルボニルノナノイル) リゾレシチンの合成
 合成例2で得られた 2-(9- ベンジルオキシカルボニルノナノイル) リゾレシチン 3.91 g (5.00mmol) をメタノール-水 (225ml/25ml) に溶解させ、水酸化パラジウム 3.0 gを加えた。水素置換後 15 時間 1 気圧、室温で撹拌した。セライトで濾

[0033]

(Synthesis example 3)

A synthesis of 2-(9-hydroxy carbonyl nonanoyl) lysolecithin

2-(9-benzyloxycarbonyl nonanoyl) lysolecithin 3.91g (5.00 mmol) obtained by the synthesis example 2 is dissolved in methanol- water (225 ml / 25 ml).

3.0g of palladium hydroxides was added.

It stired at one barometric pressure and room temperature after hydrogen displacement for 15 hours.

過し減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムより精製して、標記化合物 2.37 (3.41mmol、61%) を得た。

After filtering and evaporating by cerite, a residue is purified from a silica-gel column, the title compound 2.37 (3.41 mmol, 61 %) was obtained.

【0034】

(合成例4)

2-(9- ヒドロキシカルボニルノナノイル) リゾレシチンの活性エステル体の合成

合成例3で得られたカルボン酸 2.0 g (2.98mmol) をジクロロメタン 50ml に溶解させて0℃に冷却し、N-ヒドロキシスクシンイミド 343mg(2.98mmol)、テトラゾール 209mg(2.98mmol) をこの順で加えた。次に DDC 769mg(3.73mmol) をジクロロメタン8mlに溶解した。この溶液をゆっくり滴下し、室温で15時間攪拌した。不溶物をセライトで濾過し、活性エステル体のジクロロメタン溶液を得た。

[0034]

(Synthesis example 4)

A synthesis of the activated-ester object of 2-(9-hydroxy carbonyl nonanoyl) lysolecithin

2.0g (2.98 mmol) of carboxylic acid obtained by the synthesis example 3 is dissolved in dichloromethane 50 ml, and it cools to 0 degrees-Celsius, n-hydroxysuccinimide 343 mg (2.98 mmol) and tetrazole 209 mg (2.98 mmol) were added by this order.

Next, DDC769 mg (3.73 mmol) was dissolved in dichloromethane 8 ml.

This solution is added dropwise slowly, it stirred at room temperature for 15 hours.

An insoluble matter is filtered by cerite, the dichloromethane solution of an activated-ester object was obtained.

【0035】

(合成例5)

11- ベンジルオキシカルボニル-1- ウンデカン酸無水物の合成
 合成例1と同様に11- ベンジルオキシカルボニル-1- ウンデカン酸より合成した。

[0035]

(Synthesis example 5)

A synthesis of a 11-benzyloxycarbonyl -1-undecanoic-acid anhydride

It compounded from the 11-benzyloxycarbonyl -1- undecanoic acid like the synthesis example 1.

【0036】

(合成例6)

2-(11-ベンジルオキシカルボニ

[0036]

(Synthesis example 6)

A synthesis of 2-(11-benzyloxycarbonyl

ルウンデカノイル) リゾレシチ
 ンの合成
 合成例 2 と同様に合成例 5 で得
 られた酸無水物より合成した。

undecanoyl) lysolecithin

It compounded from the acid anhydride
 obtained by the synthesis example 5 like the
 synthesis example 2.

【 0 0 3 7 】

(合成例 7)

2-(11-ヒドロキシカルボニルウ
 ンデカノイル) リゾレシチンの
 合成
 合成例 3 と同様に合成例 6 で得
 られたベンジルエステル体より
 合成した。

[0037]

(Synthesis example 7)

A synthesis of 2-(11-hydroxy carbonyl
 undecanoyl) lysolecithin

It compounded from the benzyl ester obtained
 by the synthesis example 6 like the synthesis
 example 3.

【 0 0 3 8 】

(合成例 8)

2-(11-ヒドロキシカルボニルウ
 ンデカノイル) リゾレシチンの
 活性エステル体の合成
 合成例 4 と同様に合成例 7 で得
 られたカルボン酸より合成し
 た。

[0038]

(Synthesis example 8)

A synthesis of the activated-ester object of
 2-(11-hydroxy carbonyl undecanoyl) lysolecithin

It compounded from carboxylic acid obtained by
 the synthesis example 7 like the synthesis
 example 4.

【 0 0 3 9 】

(合成例 9)

6-ベンジルオキシカルボニル
 -1- ヘキサン酸無水物の合成
 合成例 1 と同様に 6-ベンジルオ
 キシカルボニル-1- ヘキサン酸
 より合成した。

[0039]

(Synthesis example 9)

A synthesis of a 6-benzyloxycarbonyl -1-
 hexane acid anhydride

It compounded from 6-benzyloxycarbonyl -1-
 hexanoic acid like the synthesis example 1.

【 0 0 4 0 】

(合成例 10)

2-(6- ベンジルオキシカルボニ
 ルヘキサノイル) リゾレシチン
 の合成

[0040]

(Synthesis example 10)

A synthesis of 2-(6- benzyloxycarbonyl
 hexanoyl) lysolecithin

It compounded from the acid anhydride

合成例 2 と同様に合成例 9 で得られた酸無水物より合成した。 obtained by the synthesis example 9 like the synthesis example 2.

【 0 0 4 1 】

(合成例 1 1)

2-(6- ヒドロキシカルボニルヘキサノイル) リゾレシチンの合成

合成例 3 と同様に合成例 1 0 で得られたベンジルエステル体より合成した。

[0041]

(Synthesis example 11)

A synthesis of 2-(6-hydroxy carbonyl hexanoyl) lysolecithin

It compounded from the benzyl ester obtained by the synthesis example 10 like the synthesis example 3.

【 0 0 4 2 】

(合成例 1 2)

2-(6- ヒドロキシカルボニルヘキサノイル) リゾレシチンの活性エステル体の合成

合成例 4 と同様に合成例 1 1 で得られたカルボン酸より合成した。

[0042]

(Synthesis example 12)

A synthesis of the activated-ester object of 2-(6-hydroxy carbonyl hexanoyl) lysolecithin

It compounded from carboxylic acid obtained by the synthesis example 11 like the synthesis example 4.

【 0 0 4 3 】

(合成例 1 3)

2-(4- ヒドロキシカルボニルブチロイル) リゾレシチンの合成

合成例 3 と同様に無水グルタル酸より合成した。精製は ODS (オクタデシルシラン) を充填したカラムにより行った。

¹H-NMR (CDCl₃)

0.84(t,3H),1.20(brs),1.52-1.60(brs,2H),1.80-1.95(m,2H),2.20-2.40(m,6H),3.35(s,9H),3.780(m,4H),3.90-4.35(m,4H),5.20(m,1H).

[0043]

(Synthesis example 13)

A synthesis of 2-(4-hydroxy carbonyl butyroyl) lysolecithin

It compounded from the glutaric acid anhydride like the synthesis example 3.

The column filled with ODS (octadecyl silane) performed purification.

¹H-NMR(CDCl₃)

0.84(t,3H),1.20(brs),1.52-1.60(brs,2H),1.80-1.95(m,2H),2.20-2.40(m,6H),3.35(s,9H),3.780(m,4H),3.90-4.35(m,4H),5.20(m,1H).

【0044】

(合成例14)

2-(4-ヒドロキシカルボニルブチロイル) リゾレシチンの活性エステル体の合成

合成例4と同様に合成例13で得られたカルボン酸より合成した。

[0044]

(Synthesis example 14)

A synthesis of the activated-ester object of 2-(4-hydroxy carbonyl butyroyl) lysolecithin

It compounded from carboxylic acid obtained by the synthesis example 13 like the synthesis example 4.

【0045】**【実施例】**

上記合成例で製造した化合物を用いてレシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD を下記のA～Cの方法を用いて製造した。

方法A：活性エステル溶液のジクロロメタンを留去し、50mM ホウ酸緩衝液(pH8.5) に溶解した

Cu-Zn 型

Cys-111-ME-h-SOD 溶液を添加し、0℃で1時間、更に室温で2時間反応させる。反応液を濾過し、セファクリルS-300

(ファルマシア社製)を担体としたゲル濾過カラムに付し、反応緩衝液と同一の緩衝液で溶出する。次いで、レシチン化 Cu-Zn型 Cys-111-ME-h-SOD 溶出分画を集め、限外濾過により濃縮する。

[0045]

(Example)

Lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD was manufactured using the method of following A-C using the compound manufactured by the above-mentioned synthesis example.

Method A: Distilling the dichloromethane of an activated-ester solution, the Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD solution which dissolved in 50-mM boric-acid buffer (pH8.5) is added, it is 0 degrees-Celsius and is 1 hour, furthermore, it is made to react at room temperature for 2 hours.

A reaction mixture is filtered, sephacryl S-300 (product made from Pharmacia K.K.) is attached in the gel-filtration column made into the carrier, it elutes with the buffer of the same as reaction buffer.

Subsequently, lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD elution fractions are collected, and it concentrates with an ultrafiltration.

【0046】

方法B：活性エステル溶液のジクロロメタンを留去し、DMF に溶解させた。これを 50mM ホ

[0046]

Method B: Distilling the dichloromethane of an activated-ester solution, it was made to dissolve in DMF.

ウ酸緩衝液(pH8.5)に添加し、不溶物を濾過後同一緩衝液に溶解して0℃に冷却したCu-Zn型Cys-111-ME-h-SOD溶液に滴下する。この時、Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SOD溶液にDMFを50%加えておく。0℃で15時間攪拌後、方法Aと同様に精製する。

This is added to 50-mM boric-acid buffer (pH8.5), it is added dropwise at the Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD solution which dissolved the insoluble matter in the same buffer after filtration, and was cooled to 0 degrees-Celsius. At this point, DMF is added to the Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD solution 50%. It purifies like Method After 15-hour stirring at 0 degrees-Celsius.

【0047】

方法C：50mM ホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解したCu-Zn型Cys-111-ME-h-SOD溶液に、20%のDMFを加え、0℃に冷却し、方法Bと同様に調製した活性エステルのDMF溶液をゆっくりと滴下する。0℃で15時間攪拌後、方法Aと同様に精製する。

[0047]

20% of DMF is added to the Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD solution which dissolved in C:50 mM boric-acid buffer (pH8.5) of method, and it cools to 0 degrees-Celsius, the DMF solution of an activated ester prepared like Method B is added dropwise slowly. It purifies like Method After 15-hour stirring at 0 degrees-Celsius.

【0048】

(実施例1)

Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SOD 1分子あたりレシチン誘導体が平均2個結合したレシチン化Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SODの合成
 50mM ホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解させたCu-Zn型Cys-111-ME-h-SODと、Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SODの全アミノ基に対して0.4倍モル量の合成例4で合成した活性エステルとを方法Aに従って反応させた。反応溶液をゲル濾過、イオ

[0048]

(Example 1)

A synthesis of lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD which an average of two lecithin derivatives connected per Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD 1 molecule
 Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD dissolved in 50-mM boric-acid buffer (pH8.5) and the activated ester compounded by the 0.4-times mole amount synthesis example 4 to all the amino groups of Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD were made to react according to Method A.
 The gel filtration and the ion exchange chromatography purified the reaction solution.

ン交換クロマトグラフィーにより精製した。タンパク質濃度をローリー法 (Lowry, O.H.ら、(1951) J. Biol. Chem., 193, 265)、Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD の残存アミノ基をTNBS法 (トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム塩、Goodwin, J.F. ら、(1970) Clin. Chem., 16, 24) で行うことにより Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD 1 分子当たりのレシチン誘導体の結合数を求めたところ、平均 2.0 個であった。

As for protein concentration, lowry method (Lowry, O.H. et al., (1951) J. Biol. Chem., 193, 265), as for the residual amino group of Cu-Zn type Cys-111-ME-h-SOD, tNBS method (16 a trinitro benzenesulfonic-acid sodium salt, Goodwin, J.F. et al., (1970) Clin. Chem., 24), and It found for the connection number of the lecithin derivative per Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD 1 molecule. They were an average of 2.0 pieces.

【0049】

(実施例 2)

Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD 1 分子あたりレシチン誘導体が平均 4 個結合したレシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD の合成
 50mM ホウ酸緩衝液(pH8.5) に溶解させた Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD と、Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD の全アミノ基に対して 0.8 倍モル量の合成例 14 で合成した活性エステルとを方法 B に従って反応させた。実施例 1 と同様に精製し、Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD 1 分子当たりのレシチン誘導体の結合数を求めたところ、平均 4.0 個であった。

[0049]

(Example 2)

A synthesis of lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD which an average of four lecithin derivatives connected per Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD 1 molecule
 Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD dissolved in 50-mM boric-acid buffer (pH8.5) and the activated ester compounded by the 0.8-times mole amount synthesis example 14 to all the amino groups of Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD were made to react according to Method B.
 It purifies like Example 1, when found for the connection number of the lecithin derivative per Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD 1 molecule, they were an average of 4.0 pieces.

【0050】

(実施例3)

Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD 1
 分子あたりレシチン誘導体が平均 8 個結合したレシチン化 **Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD** の合成
 50mM ホウ酸緩衝液(pH8.5) に溶解させた **Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD** と、**Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD** の全アミノ基に対して 2.0 倍モル量の合成例 8 で合成した活性エステルとを方法 C に従って反応させた。実施例 1 と同様に精製し、**Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD 1** 分子当たりのレシチン誘導体の結合数を求めたところ、平均 8.0 個であった。

[0050]

(Example 3)

A synthesis of lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD which an average of eight lecithin derivatives connected per Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD 1 molecule
 Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD dissolved in 50-mM boric-acid buffer (pH8.5) and the activated ester compounded by the 2.0-times mole amount synthesis example 8 to all the amino groups of Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD were made to react according to Method C.
 It purifies like Example 1, when found for the connection number of the lecithin derivative per Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD 1 molecule, they were an average of 8.0 pieces.

【0051】

(実施例4)

マウス虚血性足浮腫モデルにおけるレシチン化 **Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD** の抑制効果
 ICRマウス(雄性、6週令)を日本チャールス・リバー(株)より購入し、実験に用いた。ICRマウスに尾静脈より、被験薬剤としてレシチン化 **Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD** または **Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD** を投与し、右足首を市販の輪ゴム(1x1mm、直径 42mm)で5回巻き付けた。このまま 20 分虚血した後、輪ゴムをはさみで取

[0051]

(Example 4)

The inhibitory effect of lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD in a mouse ischemic paw-edema model
 An ICR mouse (male, 6 weeks old) is purchased from Japanese Charles River, it used for experiment.
 From a caudal vein, lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD or Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD is administered as a test-drug medicine to an ICR mouse, the right leg head was wound 5 times with the commercial rubber band (1x1 mm, diameter 42 mm).
 After carrying out ischemia as it is for 20

り除き、再還流させた。30 分後
ゲージを用いて右足の厚さを測
定した。この時コントロールと
して左足の厚さを測定した。

minutes, the rubber band was removed with
scissors and made to re-reflux.

The thickness of a right leg was measured after
30 minutes using the gauge.

At this point, the thickness of a left leg was
measured as control.

【0052】

被験薬剤としては、レシチン化
Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD
(実施例 2 で合成、30000U/kg
または 60000U/kg を使用)、ま
たは Cu-Zn 型
Cys-111-ME-h-SOD

(60000U/kg を使用) を用い
た。統計学的処理として
Mann-Whitney のU検定を用い
て有為差検定を行い、 $P < 0.05$
を有意差ありと判定した。この
試験結果を表 1 に示す。

[0052]

As a test-drug medicine, lecithin-izing Cu- Zn
type Cys-111-ME-h-SOD (a synthesis,
30000U/kg, or 60000U/kg was used in Example
2) or Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD
(60000U/kg was used) was used.

The capable difference assay was performed
using U assay of Mann-Whitney as statistical
treatment, and $P < 0.05$ was judged to be those
with a significant difference.

This test result is shown to Table 1.

【0053】

[0053]

【表 1】

[TABLE 1]

(マウス虚血足浮腫に対する抑制効果)

被験薬剤	投与量	抑制率
コントロール		—
レシチン化 Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SOD	30000U/kg	23.5%
レシチン化 Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SOD	60000U/kg	33.8%
Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SOD	60000U/kg	15.2%

The inhibitory effect with respect to mouse ischemia paw edema

Test-drug medicine; Dosage; Suppression rate

Control

Lecithin-ized ...

Lecithin-ized ...

Cu-Zn type Cys...

【0054】

この結果より、実施例2のレシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD 30000U/kg、60000U/kg 投与群はコントロールに比較してそれぞれ、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ で差が見られ、効果があったと判定された。また、Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD 60000U/kg 投与群と比較しても、効果があることが判ったことから、実施例2のレシチン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD は、Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD よりフリーラジカルを有意に低減することから効果的であったと判定された。

【0055】

また、被験薬剤として銅および亜鉛が配位した 111 位がセリンで示されるヒト由来のスーパーオキシドディスムターゼ（以下、Cu-Zn 型 Ser-111-r-h-SOD という）のレシチン化体（実施例2と同様にして合成した）を用いた場合とを比較した結果を表2に示した。その結果、レシ

[0054]

From this result, as for lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD30000U/kg of Example 2, and a 60000U/kg administration group, a difference is respectively seen by $P < 0.05$ and $P < 0.01$ compared with control, it was judged with it having been effective.

Moreover, since it turned out that it is effective even if compared with the Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD60000U/kg administration group, it judged that lecithin-izing Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD of Example 2 was effective from decreasing a free radical significantly from Cu- Zn type Cys-111-ME-h-SOD.

[0055]

Moreover, the result of having compared the case where the lecithin-izing object (it compounded like Example 2) of the superoxide dismutase (henceforth Cu- Zn type Ser-111-r-h-SOD) derived from a human with which the 111st position which copper and zinc configured as a test-drug medicine is shown by serine was used was shown to Table 2. Consequently, even if lecithin-izing Cu- Zn type

チン化 Cu-Zn 型 Cys-111-ME-h-SOD compared with
 Cys-111-ME-h-SOD は、レシチ lecithin-izing Cu- Zn type Ser-111-h-SOD, it was
 ン化 Cu-Zn 型 Ser-111-h-SOD understood that an inhibitory effect is high.
 と比較しても、抑制効果が高い
 ことが判った。

【0056】

[0056]

【表2】

[TABLE 2]

(マウス虚血足浮腫に対する抑制効果)

被験薬剤	投与量	抑制率
コントロール		—
レシチン化 Cu-Zn型Cys-111-ME-h-SOD	30000U/kg	24.5%
レシチン化 Cu-Zn型Ser-111-h-SOD	30000U/kg	14.7%

The inhibitory effect with respect to mouse ischemia paw edema

Test-drug medicine; Dosage; Suppression rate

Control

Lecithin-ized Cu-Zn type Cys...

Lecithin-ized Cu-Zn type Ser...

【0057】

[0057]

以上のように、実施例2のレシ
 チン化 Cu-Zn 型
 Cys-111-ME-h-SOD は、マウス
 虚血足浮腫に対して抑制効果が
 見られた。また、レシチン化
 Cu-Zn型 Cys-111-ME-h-SODを
 マウスに 60000U/kg 静脈投与
 した結果、いずれも死亡例は見
 られなかった。

As mentioned above, as for lecithin-izing Cu- Zn
 type Cys-111-ME-h-SOD of Example 2, the
 inhibitory effect was seen to the mouse
 ischemia paw edema.

Moreover, the 60000U/kg intravenous
 administration of lecithin-izing Cu- Zn type
 Cys-111-ME-h-SOD was carried out to the
 mouse.

Consequently, as for the example of death,

neither was seen.

【 0 0 5 8 】

[0058]

【発明の効果】

本発明のレシチン化スーパーオキシドディスムターゼは、スーパーオキシドディスムターゼと化学的橋かけを経てレシチンに結合させたものである。従来の修飾体と比較すると生体内分布、細胞親和性が著しく異なることが期待でき、薬理活性の強化が図られたという効果を有する。

[ADVANTAGE of the Invention]

The lecithin-izing superoxide dismutase of this invention was combined with the lecithin passing through the superoxide dismutase and the chemical crossbond.

It can anticipate that biological-body interior division cloth will differ from cell affinity remarkably compared with the conventional modified form, and has the effect that the pharmacological activity was strengthened.



DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)